

Aplicación de un método alternativo al conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de *Trichomonas vaginalis*

Lic. Alfredo Meneses Marcel,¹ Dra. Lázara Rojas,² Dr. Sergio Sifontes Rodríguez,³ Lic. Yamilé López⁴ y Lic. Idalia Sariego Ramos⁴

RESUMEN

Se demostró que existe relación entre la concentración celular y la lectura de los parásitos en un lector de ELISA. Se determinó que la absorbancia tiene valores significativos en las longitudes de onda del rango visible y se escogió la longitud de onda mínima posible (450 nm) para garantizar un máximo de sensibilidad. Pudo comprobarse que ocurre un aumento significativo de la absorbancia ($p < 0,001$) después de llenada la placa, que se estabiliza en el intervalo de 40 min hasta 4 h. Al aplicar 100, 150, 200 ó 300 μL por pozo de las diferentes concentraciones de células se demostró que el volumen óptimo era de 150 μL , se obtuvo un $r^2 = 0,9986$, y resultaron altamente significativos el coeficiente de correlación ($p < 0,001$) y la pendiente ($p < 0,001$). En el intervalo de 5×10^4 a $1,5 \times 10^7$ células/mL se obtuvo un coeficiente de variación medio de 1,75 % (0,25-3,17 %). En estas condiciones el límite de cuantificación fue de $5,14 \times 10^4$ células/mL. Por último se demostró que hubo significación de la correlación entre el conteo en cámara de Neubauer y la densidad óptica.

DeCS: CAMARAS DE DIFUSION DE CULTIVOS; TRICHOMONAS VAGINALIS/aislamiento & purificación; TRICHOMONAS VAGINALIS/crecimiento & desarrollo; TESTS DE ELISA/método.

La trichomonosis humana es una infección del aparato genital causada por el protozoo *Trichomonas vaginalis*. Es una enfermedad cosmopolita y su principal mecanismo de transmisión es el contacto sexual. Al parecer no confiere una inmunidad importante y las reinfecciones son muy frecuentes, unido a la creciente resistencia a los medicamentos, las reacciones adversas de algunos de ellos (derivados nitroimidazólicos), la contraindicación en mujeres embarazadas del metronidazol y la baja frecuencia de curación de los tratamientos tópicos hace que la búsqueda de nuevos fármacos ocupe un lugar importante en el campo de la medicina.¹⁻³

En los estudios preclínicos de nuevos productos es necesario realizar ensayos *in vitro* e *in vivo*. El método comúnmente empleado para

determinar concentración de *T. vaginalis* es el conteo en cámara de Neubauer. Hay autores que han recurrido a otras técnicas como Kaneda y otros⁴ que determinan la concentración de *T. vaginalis* frente al sulfato de barberina mediante un hematocitómetro, pero no hacen referencia a la correlación del método respecto al conteo en cámara de Neubauer.

Teniendo en cuenta los aspectos referidos anteriormente, el propósito de los autores de este trabajo fue demostrar que la densidad óptica (DO) es factible utilizarla para determinar la concentración de *T. vaginalis*.

MÉTODOS

Se trabajó con la cepa No. 8 y la cepa A de *T. vaginalis* en medio de TYI-S-33 suplementado

¹ Licenciado en Ciencias Biológicas.

² Especialista de II Grado en Microbiología.

³ Especialista de I Grado en Microbiología.

⁴ Licenciada en Ciencias Biológicas.

con 10 % de suero de ternero y antibiótico.⁵ Estas fueron aisladas en el Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” a partir del exudado vaginal de 2 pacientes con trichomonosis.

ESTABILIDAD COLORIMÉTRICA DEL MEDIO TYI-S-33 DURANTE LA INCUBACIÓN

En aras de determinar si es posible leer directamente los cultivos sin necesidad de realizar lavados de estos, se procedió a comprobar si el medio cambia por sí solo su DO durante la incubación. Para ello se determinó la variabilidad del medio TYI-S-33 por el efecto de la temperatura en ausencia de *T. vaginalis*, se midió la absorbancia de este desde las 0 hasta las 72 h de incubación a 37 °C, con una frecuencia de muestreo de 24 h.

Se realizaron 6 réplicas por cada toma de muestra y se repitió el experimento 2 veces. La longitud de onda (λ) empleada fue de 450 nm. Los datos fueron procesados por un análisis de varianza y una prueba de Duncan.

VARIACIÓN COLORIMÉTRICA DEL MEDIO DE CULTIVO POR EL CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS

Para comprobar los cambios colorimétricos del medio de cultivo inducidos por el crecimiento de los parásitos se determinó las diferencias entre las densidades ópticas (DO) de cultivos en los que hubo crecimiento y otros en los que no hubo crecimiento. A todos los tubos se le añadieron 6 mL de cultivo de *T. vaginalis* (cepa No. 8) en fase de crecimiento logarítmico. A un grupo se le agregó 60 μ L de formaldehído 37 % en el momento de añadir el inóculo de parásitos con el objetivo de evitar el crecimiento, mientras al otro grupo se le añadió la misma cantidad de agua destilada estéril. Ambos fueron incubados a 37 °C durante 48 h y posteriormente lavados 2 veces con formaldehído 1 %. A la muestra conservada con formaldehído 1 % se le realizaron lecturas con una λ de 450 nm. Se analizaron 3 réplicas y fue repetido 2 veces. La diferencia entre ambos grupos fue determinada por un análisis de varianza de clasificación doble.

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL CULTIVO DEL AISLAMIENTO NO. 8 DE *T. VAGINALIS*

Se realizó un barrido espectrofotométrico desde 190 a 700 nm a un cultivo de parásitos de la cepa No.8 los cuales fueron lavados 2 veces y conservados en formaldehído 1 %. Las muestras fueron tomadas a las 24, 48, 72, 96 y 120 h y se usó formaldehído 1 % como blanco. Se utilizó un espectrofotómetro de barrido PU 8700.

SELECCIÓN DE VOLUMEN ÓPTIMO DE MUESTRA

A partir de cultivos de la cepa No. 8 de *T. vaginalis* se realizaron los experimentos para seleccionar el volumen óptimo. Los cultivos fueron centrifugados a 3 000 rpm durante 10 min. El paquete celular fue resuspendido en formaldehído 1 %. Todas las diluciones fueron preparadas siguiendo un factor de dilución, que fue calculado para cada caso en particular mediante la fórmula siguiente (Sifontes RS, Marrero CO. Reproducción experimental de las enfermedades por *Neisseria meningitidis* B y *Haemophilus influenzae* tipo b en ratones. [Trabajo de Diploma]. Ciudad de La Habana: Instituto Finlay, 1993:54.):

$$FD = ND - 1 \sqrt{\frac{CM}{Cm}}$$

Donde:

FD = Factor de dilución.

CM = Concentración mayor.

Cm = Concentración menor.

ND = Número de diluciones.

Para determinar la DO en un lector de ELISA se utilizaron placas de 96 pozos en las cuales se distribuyeron las diluciones según esquema del experimento. En todos los casos se utilizó formaldehído 1 % como blanco.

DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD Y COEFICIENTES DE VARIACIÓN

Partiendo de una solución concentrada de $1,78 \times 10^7$ células/mL se realizaron 8 diluciones seriadas hasta llegar a 5×10^4 células/mL. Se

añadieron 100, 150, 200 y 300 μL de las diluciones celulares y se incluyeron 4 réplicas por cada dilución en 2 placas de 96 pozos. Para cada volumen fue utilizado un blanco con formaldehído 1 % y se leyó a una λ de 450 nm. A los datos agrupados por volumen y concentración de *T. vaginalis* se les realizó un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados de la DO en función de las concentraciones celulares y se determinó el coeficiente de variación para cada volumen.

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección y cuantificación para cada volumen utilizado se calculó mediante las fórmulas siguientes:⁶

$$L_d = \frac{(\text{media}_{\text{blanco}} + 3 * SD_{\text{blanco}})}{b}$$

$$L_c = \frac{(\text{media}_{\text{blanco}} + 10 * SD_{\text{blanco}})}{b}$$

Donde:

Ld = Límite de detección.

Lc = Límite de cuantificación.

b = pendiente.

En función del coeficiente de determinación lineal (R^2), el coeficiente de variación (CV) medio de las DO y el límite de cuantificación se determinó el volumen óptimo a emplear. Una vez elegido este se llevó a cabo un análisis de la significación estadística de la correlación y de la pendiente según *Castro* y otros.⁶

ESTUDIO DE LINEALIDAD CON UNA $\lambda = 650 \text{ nm}$

A un cultivo de 48 h de la cepa No. 8, centrifugado y resuspendido en formaldehído 1 % se le realizaron 5 diluciones seriadas entre $1,2 \times 10^6$ y 5×10^4 células/mL. Por cada dilución se utilizaron 8 réplicas y se añadieron 150 μL en una placa de 96 pozos que se leyó a 650 nm.

Se calculó la media de la absorbancia para cada dilución y a los datos obtenidos se les realizó un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados de la DO en función de las concentraciones celulares.

SELECCIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE LECTURA

Usando una misma concentración de *T. vaginalis* de la cepa No. 8, distribuida en una columna de la placa de 96 pozos, se le realizaron lecturas en el lector de ELISA a 450 nm cada 5 min en la primera hora y a partir de esta cada 15 min hasta las 4 h. Los datos fueron agrupados según tiempo de lectura y sometidos a un análisis de varianza y una prueba de Duncan. El tiempo óptimo se seleccionó tomando en consideración el intervalo donde se estabilizó la absorbancia.

CORRELACIÓN ENTRE DO Y CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER

Con el objetivo de evaluar si el comportamiento seguido hasta este momento con el aislamiento No. 8 se puede obtener en otras cepas aisladas en el laboratorio se realizó el experimento de correlación de la DO y el conteo en cámara de Neubauer a la cepa A y la cepa No. 8. Ambas fueron lavadas 2 veces y conservadas con formaldehído 1 %. Posteriormente se realizaron 6 diluciones seriadas para evaluarlas por conteo en cámara de Neubauer y por DO a 450 nm. A los datos se les realizó un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados, correlacionando la DO con el conteo en cámara de Neubauer. A las rectas obtenidas se les realizaron pruebas de significación de la pendiente y significación de la correlación según *Castro* y otros.⁶

RESULTADOS

Al determinar la DO del medio de Diamond durante 3 d y partiendo del tiempo 0, se comprobó que esta aumenta según el tiempo de incubación con diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre las 24 y 48 h y entre las 48 y 72 h posincubación (tabla 1). Se pudo además comprobar que el crecimiento de *T. vaginalis* enturbia el medio de cultivo. Ello se demostró con el incremento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) de la DO en el sobrenadante del cultivo donde hubo crecimiento en comparación con aquel en el que fueron inactivados los parásitos inmediatamente después de inoculados con formaldehído 37 % (tabla 2).

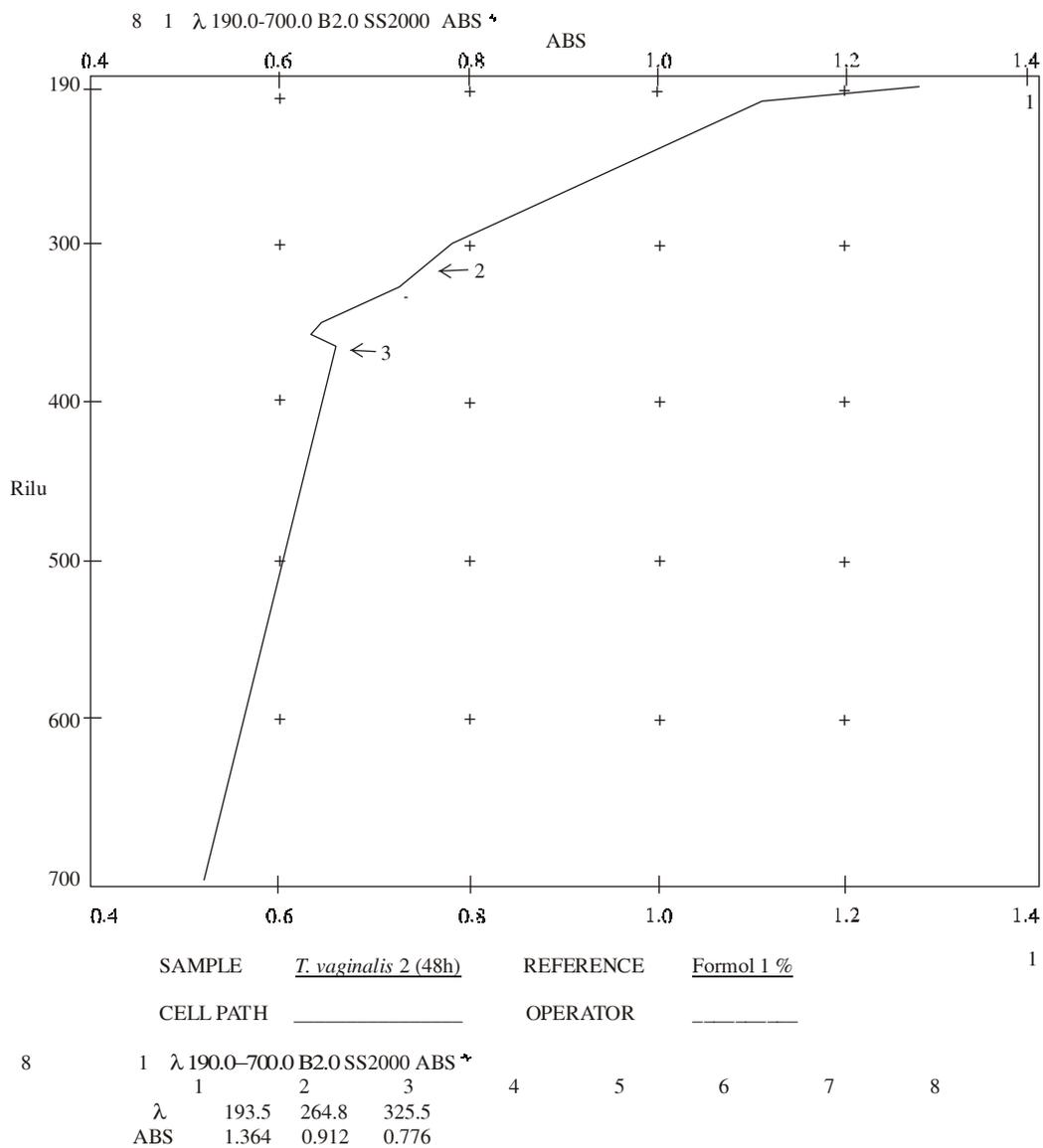


Fig. 1. Curvas de absorbancia de las longitudes de onda (λ).

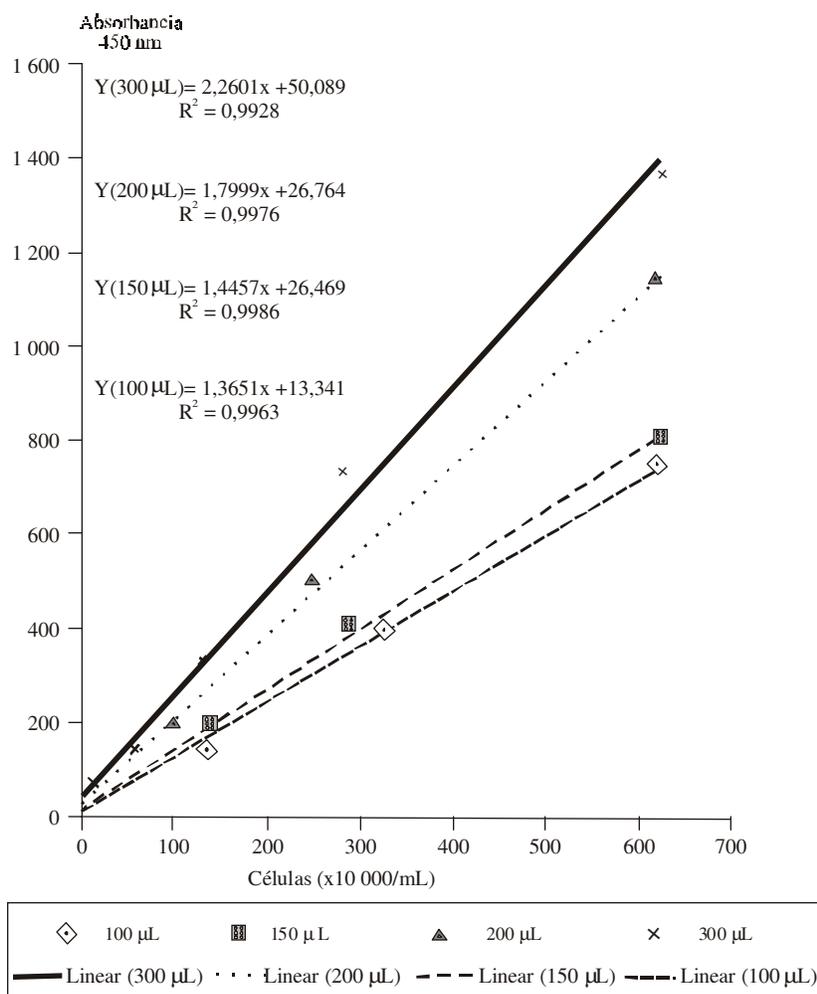
TABLA 1. Estabilidad colorimétrica del medio TYI-S-33 durante la incubación

Muestra No.	Tiempo incubación	n	Absorbancia 450 nm	Prueba de DUNCAN
1	0	6	0,360	4-3 **
2	24	12	0,379	3-2 **
3	48	12	0,484	2-1 ns
4	72	12	0,561	

TABLA 2. Estabilidad colorimétrica del medio de cultivo por el crecimiento de parásitos

Ensayo No.	Réplica	Medio de cultivo	
		Sin crecimiento (a)	Con crecimiento (b)
1	1	280,17	501,33
	2	289,17	516,67
	3	288,33	526,83
	Media	285,89	514,94
2	1	288,33	620,00
	2	288,33	595,17
	3	289,17	584,33
	Media	288,61	599,83

a,b difieren estadísticamente para $p < 0,001$.

**Fig. 2.** Curvas de absorbancia vs. concentración de células de *T. vaginalis* con el uso de diferentes volúmenes.

En la figura 1 se puede observar que la absorbancia de las λ del rango evaluado tienen valores significativos. Se aprecia además que en la medida en que aumenta la λ , disminuye progresivamente la absorbancia. Por esta razón se escogió la λ de 450 nm que es la menor λ posible con la que se pudo trabajar y de esta forma garantizar un máximo de sensibilidad.

En la figura 2 se demuestra que existe linealidad en todos los volúmenes empleados (100, 150, 200 y 300 μL) donde el coeficiente de determinación expresa el grado de relación entre la concentración de células y la absorbancia. En todos los casos R^2 está cercano a la unidad, resultó mayor para el volumen de 150 μL , y existe por lo tanto una elevada probabilidad estadística de cumplirse esta regresión.

De modo general pudo comprobarse que el coeficiente de variación (CV) (tabla 3) fue menor que 6 % para todos los volúmenes probados. Los mejores resultados se obtuvieron con 150 μL , que

mostró un CV de 1,75 % (promedio del CV de todas las concentraciones), con límites entre 3,17 y 0,25 %. Se demostró que el procedimiento tuvo una precisión adecuada.

En los volúmenes de 300, 200 y 150 μL fue posible cuantificar la concentración celular por debajo de 10^5 células/mL, esta resultó la menor concentración de células empleadas para iniciar un cultivo de *T. vaginalis* (tabla 4).

Teniendo en cuenta que con el volumen de 150 μL se obtuvo el mayor R^2 (0,9986), el menor coeficiente de variación (1,75 %) y un adecuado límite de cuantificación ($L_c = 5,14 \times 10^4$), se elige

este como el volumen óptimo de muestra (fig.3) para realizar el llenado de la placa de 96 pozos.

El hecho de que se obtenga una relación lineal entre 2 variables con un coeficiente de determinación alto, no implica que esta relación tenga un valor predictivo significativo desde el punto de vista estadístico. Al determinar la significación de la correlación se obtuvo que para $n-2$ gl (grados de libertad) y $p < 0,001$ el valor mínimo de r para que la regresión sea significativa es de 0,951, y el valor calculado para 150 μL es de 0,9993. A su vez, aun cuando la regresión sea estadísticamente significativa, puede no existir regresión cuando la

TABLA 3. Resultados de la lectura a 450 nm con diferentes volúmenes por pozo

Dilución No.	100 μL Media	SD	CV(%)	150 μL Media	SD	CV (%)
1	1,427	0,0324	2,27	1,660	0,0276	1,66
2	0,841	0,0535	6,36	0,890	0,0282	3,17
3	0,410	0,0065	1,58	0,462	0,0099	2,15
4	0,140	0,0140	9,98	0,201	0,0005	0,25
5	0,087	0,0075	8,65	0,094	0,0008	0,87
6	0,051	0,0034	6,60	0,058	0,0012	1,99
7	0,035	0,0006	1,67	0,037	0,0005	1,34
8	0,036	0,0024	6,71	0,039	0,0010	2,60
Blanco	0,029	0,0021	7,30	0,030	0,0019	6,11
Coeficiente de variación medio			5,48	1,75		

Dilución No.	200 μL Media	SD	CV (%)	300 μL Media	SD	CV (%)
1	1,727	0,0087	0,50	1,650	0,0727	4,41
2	1,099	0,0123	1,12	1,374	0,0190	1,38
3	0,578	0,0152	2,63	0,782	0,0194	2,48
4	0,239	0,0075	3,13	0,333	0,0291	8,75
5	0,105	0,0096	9,17	0,148	0,0067	4,49
6	0,065	0,0054	8,34	0,102	0,0035	3,46
7	0,045	0,0017	3,89	0,054	0,0030	5,56
8	0,043	0,0010	2,35	0,051	0,0010	1,87
Blanco	0,033	0,0034	10,39	0,035	0,0027	7,64
Coeficiente de variación medio			3,89	4,05		

TABLA 4. Cálculo de los límites de detección y cuantificación

Sin blanco	100 μL	150 μL	200 μL	300 μL
Intercepto	13,341	26,469	26,764	50,089
Pendiente	1,3651	1,4457	1,7999	2,2601
Blanco	29	30	33	35
SD blanco	2,1	1,9	3,4	2,7
Ldetección	25,9	24,7	24,0	19,1
	9,17E+04	-1,23E+04	-1,53E+04	-1,37E+05
Lcuantificación	36,6	33,9	37,2	27,4
	1,71E+05	5,14E+04	5,81E+04	-1,00E+05

pendiente sea igual a 0, de ahí que la prueba de significación de la pendiente persigue demostrar que esta es desigual de 0. Para el volumen de 150 μL , $b = 1,4457$ con límites de confianza entre 1,38 y 1,51 para un nivel de significación de 95 %, no incluido en ninguno de ellos el 0 y obteniéndose una t experimental de 59,31, muy superior al valor tabular (2,57) para 5 gl y $p < 0,001$; por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 de $b=0$ y se declara la pendiente estadísticamente significativa.

Para confirmar que se mantiene la linealidad con una λ mayor a la propuesta, se realizó una lectura a 650 nm. En la figura 4 se puede observar que aun cuando la sensibilidad del método es menor, se obtiene linealidad en el intervalo evaluado con un $R^2 = 0,9977$. Con esto se demuestra además lo que se había planteado antes (fig. 1) que en la medida en que aumenta la absorbancia, disminuye la pendiente y la sensibilidad del método es menor.

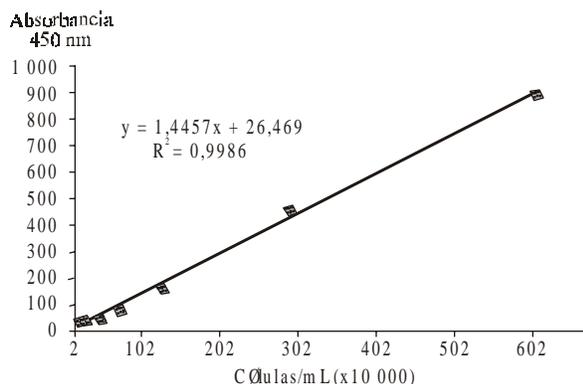


Fig. 3. Correlación absorbancia y concentración de *T vaginalis* con 150 μL .

En el llenado de la placa de 96 pozos pudo comprobarse que existe un aumento significativo de la absorbancia ($p < 0,001$) después de llenados los pozos hasta los 35 min (fig. 5). A partir de entonces la absorbancia permanece constante hasta las 4 h (tiempo máximo evaluado), no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las absorbancias registradas en este intervalo.

Al correlacionar la DO y la cantidad de células real por conteo en cámara de Neubauer se observa (figs. 6 y 7) que se obtuvieron coeficientes de correlación de 0,9966 y 0,9985 para el aislamiento 8 y A, respectivamente. En ambos casos hubo significación de la correlación para $n-2$ grados de libertad (gl) y $p < 0,001$, así como se obtuvo significación de ambas pendientes para $p < 0,001$ y 4 gl (t experimental = 34,22 y 48,84, para los aislamientos 8 y A, respectivamente. El valor tabulado fue de 2,776), por lo que existe correspondencia entre el número de células por conteo en cámara de Neubauer y la DO.

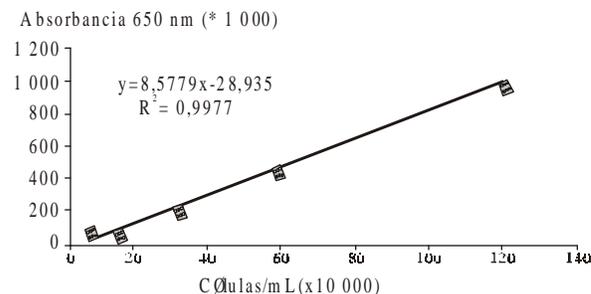


Fig. 4. Comportamiento de la linealidad con una longitud de onda de 650 nm.

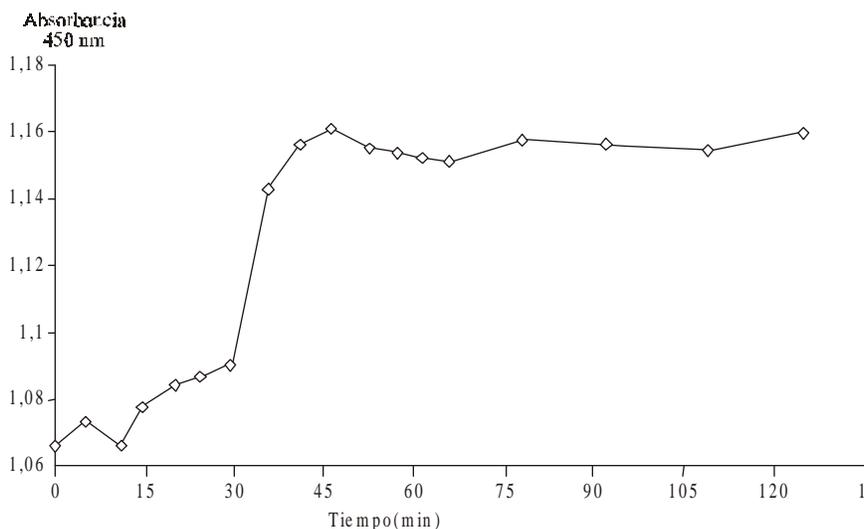


Fig. 5. Comportamiento de la absorbancia después del llenado de la placa.

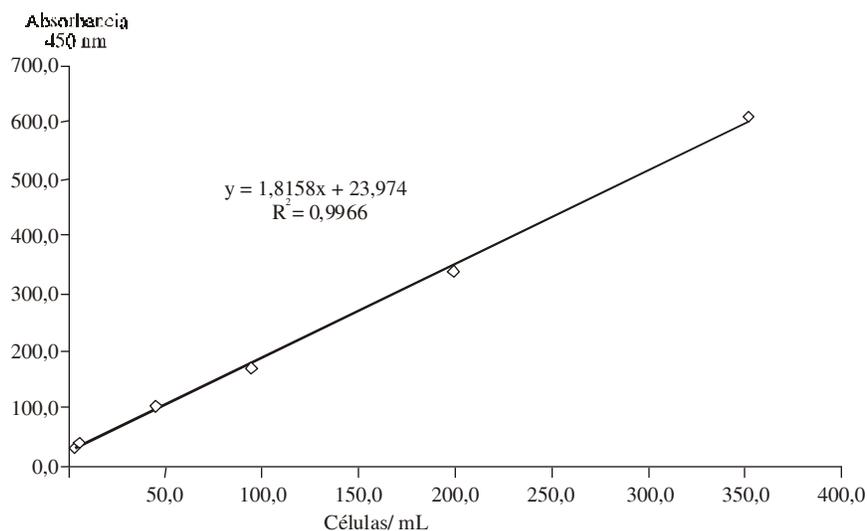


Fig. 6. Correlación densidad óptica (DO) y conteo en cámara de Neubauer (aislamiento 8).

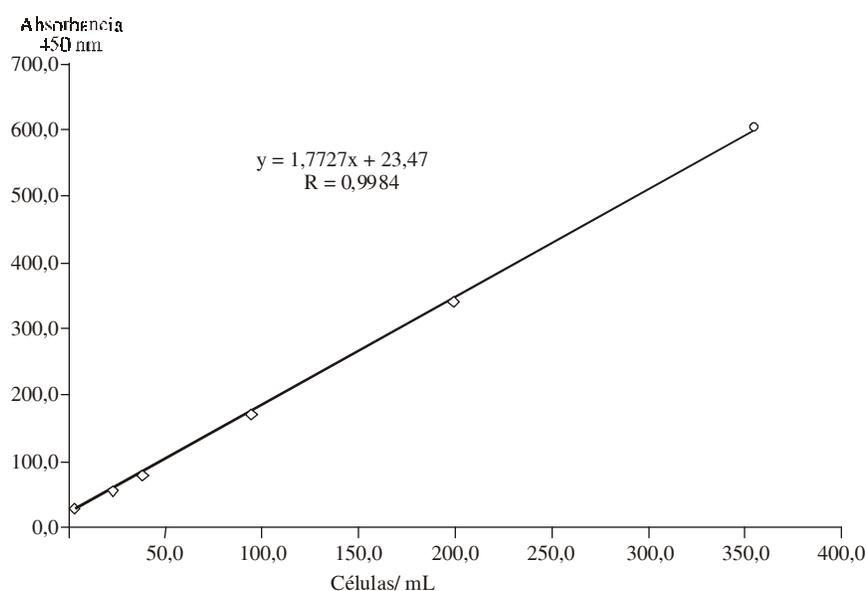


Fig. 7. Correlación densidad óptica (DO) y conteo en cámara de Neubauer (aislamiento A).

DISCUSIÓN

En los ensayos preliminares se observó que el medio de Diamond TYI-S-33 cambiaba su coloración por sí solo al someterlo a la temperatura de incubación (37 °C). Como se comprobó en los resultados la DO del medio aumenta según el tiempo de incubación. Estos cambios en la DO del medio, unido a los cambios estadísticamente significativos en la DO de los sobrenadantes de los cultivos después de centrifugados indican que no se puede utilizar el medio TYI-S-33 como blanco, ni la absorbancia de los parásitos resuspendidos en este, ya que introduciría errores al cambiar la DO. Es por ello que se adoptó como metodología

centrifugar los cultivos, se realizaron 2 lavados con formaldehído 1 % y se resuspendieron con este para su conservación y posterior lectura. Este procedimiento difiere de los seguidos por *Escario* y otros⁷ y *Kaneda* y otros,⁴ quienes utilizan los parásitos resuspendidos en el propio medio de Diamond para realizar lecturas en un espectrofotómetro ultravioleta-visible y en un hematocitómetro, respectivamente, sin tener en cuenta los cambios de la DO de este. Al centrifugar y resuspender en formaldehído 1 % y utilizando este como blanco, cualquier variación en la absorbancia, es producto de los parásitos y no de otros ingredientes del medio.

La linealidad se considera como un criterio de validación de cualquier técnica analítica, pero no es suficiente para dar el método como satisfactorio.^{8,9} En el ensayo además de la linealidad se determinaron otros parámetros como son coeficiente de variación, límites de detección y cuantificación y significación de la correlación y de la pendiente.

El método analítico debe ser capaz de cuantificar la mínima concentración celular que se va a emplear en los ensayos para el cual está destinado. En la bibliografía consultada¹⁰ se refiere 10^5 células/mL como la menor concentración para iniciar los cultivos de parásitos en tubos de cultivos. Solamente con el volumen de 100 μ L (tabla 4) no fue posible cuantificar la concentración celular por debajo de 10^5 células/mL.

En el proceso de distribución de las células en la placa de 96 pozos, transcurre un tiempo entre el llenado del primer y del último pozo, esto permite que las células de los primeros pozos sedimenten, mientras que las últimas se encuentran aún en suspensión. Por esta razón se determinó el tiempo a partir del cual las lecturas se estabilizaban y que se consideró se corresponde con el fin de la sedimentación. Como se demostró en los resultados, hasta los 40 min después de llenada la placa hay un aumento significativo de la absorbancia, esta se estabiliza a partir de este tiempo y hasta las 4 h pos-llenado que fue el tiempo máximo evaluado.

Se concluye que de los resultados obtenidos se puede inferir lo siguiente:

- No se puede utilizar el medio TYI-S-33 como blanco en las lecturas de las absorbancias
- La utilización de solución de formaldehído 1 % es la adecuada para realizar los lavados a las suspensiones de parásitos.
- La λ mínima posible (450 nm) garantiza una adecuada sensibilidad.
- Los mejores resultados se obtuvieron al añadir un volumen de 150 μ L en el llenado de la placa de 96 pozos.
- Se logró la estabilidad de la absorbancia a partir de los 40 min después de llenada la placa.
- Existe correlación entre el número de células por conteo en cámara de Neubauer y la densidad óptica.

SUMMARY

It was demonstrated that there is a relation of cell concentration with the parasite reading in an ELISA reader. It was determined that absorbance showed significant values in wavelengths of visible range and the possible minimum wavelength (450 nm) was chosen to guarantee the maximum sensitivity. Likewise, it was confirmed that absorbance significantly increased ($p < 0.001$) after the plate was filled up, it stabilized in the 40m-2h time interval when applying 100, 150, 200 or 300 μ l per well of the various cell concentrations, it was proved that the optimum volume was 150 μ l, a $r^2 = 0.9986$ was reached, and the coefficient of correction ($p < 0.001$) and the gradient ($p < 0.001$) were highly significant. In the 5×10^4 to 1.5×10^7 cell/mL interval, there was an average variation coefficient of 1.75% (0.25-3.17%). Under these conditions, the quantification limit was 5.14×10^4 cell/mL. Finally, it was shown that the correlation of counting in Neubauer chamber and optical density was significant.

Subject headings: DIFFUSION CHAMBERS; CULTURE; TRICHOMONAS VAGINALIS/isolation & purification; TRICHOMONAS VAGINALIS/growth & development; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS/method.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Michel R. Trichomoniasis. En: Goldsmith R, Heyneman D, eds. Parasitología y Medicina Tropical. Ira. Ed. México, DF: El Manual Moderno, 1995.
2. García L, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology. 2da. ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993:84-91.
3. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humana. 2da ed. Medellín, CIB. 1992:261-4.
4. Kaneda Y, Torii M, Tanaka T, Aikawa M. *In vitro* effects of berberine sulphate on the growth and structure of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. Ann Trop Med Parasitol 1991;85(4):417-25.
5. Diamond L. The establishment of various Trichomonas of animals and man in axenic cultures. J Parasitol 1957;43:488-90.
6. Castro C, Gascón F, Pujol F, Sans VP. Validación de métodos analíticos. Madrid. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 1989.
7. Escario A, Guillén L, Martínez R, Contreras M. A new method for the *in vitro* screening of Trichomonacides. Acta Univ Carol Biol 1986;30:557-62.
8. Sigma Chemical Company. Standards, controls and linearity reagents. Handbook: St. Louis, MO, 1990:22-3.
9. Tallarida RJ, Murray RB. Manual of Pharmacologic calculations with computer programs. 2ª. ed. New York: Academic Press, 1986.
10. Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A. *In vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. J Euk Microbiol 1993;40(3):262-9.

Recibido: 6 de diciembre del 2000. Aprobado: 28 de enero del 2001.
Lic. Alfredo Meneses Marcel. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuani Km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Correo electrónico:cbq@cbq.vcl.sld.cu